

「細胞形態学的実験法2」

日時：4月9日(月)16:10~17:40

題目番号：8

担当教員：徳田(大和田)、小賀(佐々木)

この講義は以下の2部構成となっている。

何れも基礎的な事項について概説する。

I. フローサイトメーター Flow cytometer

1. Flow cytometer とは

サンプル中に存在する個々の粒子の特性を、
光(蛍光)を利用して迅速かつ高感度に測定・分取する装置。

2. 製品(機能)分類 - analyzer(解析)と sorter(分取)

3. サンプル

(1) 1個ずつの細胞や粒子などの浮遊液

(2) 個々の大きさが0.3-40 μ m

(3) サンプル例

血球細胞ほか各種生物の細胞、酵母、ビーズ など。

4. 測定パラメーター

(1) 散乱光 (2) 蛍光

5. 計測可能なもの

細胞表面マーカー、細胞内マーカー、細胞内サイトカイン、細胞絶対数、細胞内酵素活性、アポトーシス、細胞周期 など。

II. バーチャルスライドを用いた細胞形態観察

本講義は、細胞形態学的実験法についての理解を深めることを目的としている。そのテーマの一つとしてバーチャルスライド(VS)をとりあげる。バーチャルスライドはパソコンを使い光学顕微鏡の機能をモニター上に実現する試みである。いくつかの解釈があるが、最近では200倍以上の拡大が可能で通常のスライドガラスの視野全域を対象とするものを指すことが多い。さらに、インターネットを介して情報のやり取りが可能なものという条件がつくこともある。グーグル社が提供するグーグルアースの組織版を想像していただくとイメージしやすいかもしれない。私たちは、教育、診断(臨床)、研究にVSシステムをいち早く導入し実践してきた。視覚情報の共有が容易となり、双方向性の議論が活発と成り、コンテンツの作成、保存、二次利用も容易となり好評である。

本講義では、以下の3つの内容について主にとりあげる予定である：1)VSシステムの概略、2)VSシステムを用いた細胞形態観察(胃を中心として)、3)VSシステムを用いた細胞形態観察研究法の1例(組織マイクロ例を中心として)。

「生理学的研究法 1」

日時：2007年4月9日（月）17：50～19：20

題目番号：9

担当教員：中村彰治、坂田義行、木田裕之

はじめに：生体の機能を評価する生理学的方法は、分子・細胞レベルから動物の行動まで多種多様である。これらの方法のどれを用いるかは、実験の目的によって決まる。ここでは、当研究室で主として用いている以下の方法について解説をする。（1）神経活動の記録法、（2）細胞内イオンの *in vivo* 測定法、（3）動物の情動・学習行動測定法。

1. 神経活動の記録法

1) 細胞外記録法

神経細胞近傍に微小ガラス電極を刺入し、活動電位を細胞外から記録する方法である。この方法は、*in vivo* での神経活動の記録に一般に用いられている。

2) 無麻酔動物での神経活動の記録

目的とする脳部位に金属電極を刺入し、細胞外記録により単一ニューロンの活動電位、脳波あるいは誘発集合電位を、無麻酔自由行動下の動物で記録する方法である。

2. 細胞内イオン濃度の *in vivo* 測定法

細胞内 Cl⁻ イオンと Ca²⁺ イオンの光学的イメージング法

Cl⁻ イオンあるいは Ca²⁺ イオン感受性蛍光色素を細胞内に負荷し、光学的にこれら細胞内イオン濃度を測定する方法。蛍光は CCD カメラで測定する。

3. 行動実験

1) 放射状迷路課題実験

空間認知記憶を調べる方法。高架式のプラットホームからのびる 8 方向のアームの先端に餌を置いておき、ラットをプラットホームに入れてその後の行動を観察する。

2) 能動的回避学習実験

2 つに仕切られた箱型の部屋にラットを入れ、10 秒間隔で繰り返す音と光の合図の後、ラットのいる側にフットショックをかける。

3) オープンフィールドテスト

ラットを新しい環境に置いた時の自発運動は、活動性や情動を反映する。歩行、立ち上がり、毛づくろい、脱糞・排尿などの行動を指標にしている。

4) 強制水泳テスト、スクローステスト

うつ様症状の評価に用いている代表的な行動実験。

「生理学的研究法 2」

日時：4月10日（火） 16:10～17:40

題目番号：10

担当：小林 誠（応用医工学系、器官制御医科学講座・生体機能分子制御学）

「生理学」とは、生命現象を自然科学的に探求し理解する学問であるが、医学系研究科においては、細胞や器官の正常機能を理解し、さらに、病気の場合にそれらの機能が破綻する機構を解明することを目的とする。

本授業では、生理学的研究法の中でも、近年、発展が著しい分子生物学、細胞生物学、遺伝子工学、蛋白工学などの手法を取り入れた「分子細胞生理学的」研究方法について概説する。具体的には、当教室で行っている実際の実験結果を提示しながら、以下の研究手法について解説する。

1．細胞機能の光学的測定法

従来、細胞機能を評価するために、しばしば組織、細胞を死滅・破砕して、解析してきた。本方法では、細胞を生かしたまま、細胞機能の経時変化をモニターできる。

2．RNA 干渉

「RNA 干渉」とは、siRNA（短い干渉 RNA・short interfering RNA）と呼ばれる 21～23 塩基からなる小さな二本鎖 RNA によって、mRNA が配列特異的に分解される結果、その遺伝子の発現が抑制される現象である。本方法によって、目的とする蛋白分子を特異的にノック・ダウンする事ができる。

3．遺伝子組換え蛋白の過剰発現

遺伝子組換えにより、目的とする蛋白の機能を活性化したり、不活性化したりすることが可能である。これらの変異を含む遺伝子（cDNA）を細胞へ導入し（transfection）遺伝子組換え蛋白を過剰発現させることによって、目的とする蛋白の機能を評価する。

4．リコンビナント蛋白の精製

目的とする蛋白機能を詳細に検討するためには、しばしばその蛋白分子を高純度に精製することが必要となる。cDNA の操作により、タグと呼ばれる分子を融合させた蛋白分子（fusion protein）を、大腸菌や昆虫細胞などに大量発現させ、タグ部分を標的にして、高純度に目的とする蛋白分子を精製する。

5．表面プラズモン共鳴（SPR；Surface Plasmon Resonance）測定法

分子間の相互作用を検討するのに、分子を標識したり、免疫沈降法を応用したりして行う事が多い。しかしながら、その場合には、標識や抗原抗体反応を用いることによって特異性の問題が生じる。本方法では、標識する事無く、直接分子間の相互作用を解析できる。

6．質量分析（MS；Mass Spectrometry）、タンデム型質量分析（MS/MS；tandem MS）

質量を高精度に測定する事によって物質そのものを同定できるため、シグナル分子の同定やリン酸化部位の同定などを行うことが可能となる。内部標準を上手に設定する事によって、微量分子の定量的測定も可能である。

「毒学実験法」

日時: 4月10日(火)17:50~19:20

題目番号: 11

担当教員: 藤宮教授、芳原教授

中毒学実験法では、中毒学に関連した実験手法のいくつかを紹介します。

毒物は薬理学や生化学的手法、形態学的手法等の多くの手法により研究されています。その部分は他の研究題目を参照してください。中毒学独自のものは、薬毒物の同定・定量法とその結果の薬物動態学的研究法・薬力学的研究法になります。

薬毒物の同定・定量分析法は、近年の分析機器の発達により、多くの研究法が開発されてきました。本授業ではそのいくつかを紹介します。また、臨床において毒物を同定する簡易検査を紹介し、臨床でも役立つ授業とする予定です。

薬力学的研究法はいわゆる薬理学領域の研究法です。

薬物動態学的研究法は薬物速度論的手法を使う解析法で、薬毒物が体内でどのように変化するかを検討する研究法にあたります。コンパートメントモデル解析、生理学的薬物速度論、モーメント解析などいくつかの手法があり、コンピュータを使った解析が行われます。本授業ではそのいくつかをアルコールを中心に実例を挙げて紹介します。

「データ解析:統計解析」

日時:2007年4月11日17時50分

題目番号:12

担当教員:原田規章(医学部衛生学教室)

大学院基礎コース:統計解析

- なぜ統計学か
- 検定と考え方
- 多変量解析
- 診断効率と正常値
- その他

分散(バラツキ)

- 生体現象に必須
- 分散は分離できる
- 分散は説明できる

誤差(error)

- 説明できない分散(バラツキ)
- 検定は誤差との比較
- 誤差1/2は例数4倍に相当

誤差とバイアス

- 偶然誤差(random error):
均等に発生するバラツキ
- 系統誤差(systematic error):
特定の方向への偏り(bias)

なぜ統計学か

- 生命現象と個体差
- 科学的認識の方法論
- 効率的な研究

検定の考え方

- 検定できるデータ
- データの特性と検定法
- 危険率5%の意味
- 多重比較問題

多変量解析(1)

- 相関係数と回帰直線
- 多要因の関与と補正
- 重回帰分析と判別分析

多変量解析(2)

- ロジスティック分析
- 生存曲線と比例ハザードモデル
- 主成分分析と因子分析

診断効率と正常値

- 感度(sensitivity)と特異度(specificity)
- ROC曲線
- Cut off point

統計パッケージソフト

- BMDP:Biomedical Computer Programs
- SPSS:Statistical Package for Social Science
- SAS:Statistical Analysis System

参考書

- バイオサイエンスの統計学, 市原清志, 南江堂, 1990
- 多変量解析による臨床研究, 浜島信之, 名大出版会, 1993
- ロジステック・Cox回帰入門, 高橋善弥太, 日本医学館, 1995
- 統計的多量比較法の基礎, 永田清他, サイエンス社, 1997
- 医学的研究のデザイン, 木原正博監訳, 医学書院, 1997
- 共分散構造分析, 入門編, 豊田秀樹, 朝倉書店, 1998
- Cox比例ハザードモデル, 中村隆, 朝倉書店, 2001
- 多変量解析実例ハンドブック, 柳井瑞夫他, 朝倉書店, 2002

「薬理学実験法」

日時：4月12日 16:10～17:40

題目番号：13

担当教員：乾 誠

1 薬理学とは

2 薬物の分類と種類

分類：薬力学的作用薬、化学療法薬、補充療法薬

種類：合成化合物、半合成化合物、核酸、蛋白質・ペプチド、天然物

3 薬物の臨床応用と作用メカニズムの関係

例) アスピリン、カルシウム拮抗薬、中枢神経作用薬

4 薬理作用の種類

5 薬理作用の解析の実際

例) リガンド結合実験

Curve fitting

Scatchard plot の理論と実際

リガンドの置換曲線

6 新薬の開発

新薬開発の全体像

新薬開発の第1ステップ(新薬の発見)

薬物ライブラリー、スクリーニング、薬物の最適化

薬物治療標的の種類

遺伝子発現、受容体、トランスポーター、シグナル伝達系、酵素活性

薬物標的の探索

バイオアッセイから標的分子へ

網羅的薬物標的の探索法：In silico アプローチ、遺伝子発現解析、蛋白質発現

解析

7 遺伝子と薬理学

Pharmacogenetics：テーラーメイド医療への応用

Pharmacogenomics：創薬への応用

8 創薬の新たな方向性

DNA チップ・DNA マイクロアレイによる治療標的分子の探索

プロテオーム解析の治療標的分子の探索

治療標的蛋白質の超微細構造解析(結晶X線構造解析)による薬物デザイン

バイオマーカーと疾患モデル動物

「細胞実験法」

日時：4月12日(木) 17:50 ~ 19:20

題目番号：3

担当教員：河野 道生 (2341, mkawano@yamaguchi-u.ac.jp)

1 はじめに:生物学的実験に組織細胞培養は必須である。細胞培養の中で細菌等の微生物の培養は「4 微生物実験法」で述べられるので、真核細胞(一般に言う細胞)の培養法について概説する。細胞培養のための準備および無菌操作等を説明する。培養技術として、浮遊細胞培養と付着細胞培養法について簡述する。応用編として、細胞の生死つまりアポトーシスの検出法、セル・ソーターを使用した細胞分取法および蛍光 tag 化した分子の細胞内動態解析を簡単に説明する。

2 細胞培養のための準備:(1)培養器具:細胞培養に使用するものは、すべて無菌滅菌処理されたものでなければ(2) 滅菌操作:乾熱滅菌法、高圧滅菌法(オートクレーブ法)、ガス(エチレンオキシド)滅菌法等がある。通常、ガラス器具は乾熱滅菌法、プラスチック等はオートクレーブ法にて行われる。(3)培養液の調:通常、リンパ球等の細胞には RPMI-1640 培地がよく使われる。市販の液体調製培地は高価(約 6,000 円/500 ml)だが、粉末培地(約 6,000 円/10L)を購入して自分で調製してろ過滅菌して使用できる。蒸留水の水質にも特に留意がいる。牛胎児血清(FCS)を用いることが多い。FCS は高価(約 30,000 円/500 ml)であり、ロットによる良し悪しもあるので予めロットのチェックをすることが望ましい。(4)滅菌および無菌操作:培養する部屋は区切られた専用の部屋にすること。紫外線(UV)殺菌灯を配備し、使用しない時は照射しておく。消毒剤(70%エタノール等)を常備する。培養操作前には必ず手先から前腕部にかけて消毒剤(70%エタノール等)を噴霧してから始める。当然、クリーンベンチあるいはバイオクリーンベンチ(強制循環排気式)内で操作する。滅菌操作にはガスバーナーからの火炎を使用する(米国では使用しないことが多い)。

3 培養技術:(1)浮遊細胞培養、(2)付着細胞培養、(3)細胞を凍結保存するには、DMSO(dimethyl sulphoxide)(終濃度 10%)を使用して緩速に(1分間に1)凍結させ、液体窒素(-196)内に保存する。簡便に凍結させるには、まずバialの外の綿を覆い小箱にいれ-20 の低温槽に入れる。翌日、液体窒素ボンベ内へ順次移して行く。

細胞のマイコプラズマ感染にも気を付けなければならない。継代細胞を用いての細胞の生理、生化学あるいは病理の研究には、マイコプラズマ感染はあってはいけない。感染が疑われる場合、また外部から移入された細胞は、まずマイコプラズマ除去剤(MC-210,大日本製薬)で1週間培養してから実験に使用する。

4 応用編:(1)アポトーシスの検出法:a)光学顕微鏡による形態学的観察、b)フローサイトメーターによる解析、単に前方散乱(FS)と側方散乱(SS)によるもの、細胞質酵素(esterase)活性を指標にする方法(FDA/ PI 法)、Annexin V と PI 染色法、c)ミトコンドリア膜電位の変化を測定する方法、d)DNA 断片化を指標にする方法、それにはアガロース電気泳動法、DNA 断片の末端標識法(TUNEL, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)および e)細胞周期解析法がある。詳細は著書を参照して頂きたい。(2)セル・ソーターを使用した細胞分取法 (3)蛍光 tag 化した分子の細胞内動態解析

5 その他:(1)細胞株の入手法: 理研ジーンバンク (<http://www.rtc.riken.go.jp/>)で希望する細胞株を検索して購入することができる(通常1アンプルが10,500円)、6 参考図書、文献:1)組織培養 中井準之助 他編集 朝倉書店 2)アポトーシス実験マニュアル 青木一正 他編集、細胞工学別冊 秀潤社

「微生物実験法」

日時：2007年4月13日（金）16:10～17:40

題目番号：4

担当教員：白井睦訓

1, はじめに：受講者の要望に即した講義とするため、講義開始時に質問事項を提出していただく。次に微生物を新たに分離し同定する場合、あるいはすでに株化されている微生物を研究対象とする場合に必要な微生物の基本的取り扱い法について概説する。次いで、応用編として細菌研究法の一部をヘリコバクター・ピロリを例に解説する。最後に、質問事項について解説する。

2. 微生物実験のための準備

- 1) 実験機器：顕微鏡、インキュベータ、クリーンベンチ、安全キャビネット、オートクレープ、フリーザーなど微生物実験に必要な機器を説明する。なお、これらの機器は、遺伝子実験施設ならびに微生物学教室に設置されている。
- 2) 実験器具と材料の準備、滅菌法と消毒法：微生物実験に必要な器具と材料（培地など）を説明する。また、滅菌法と消毒法を解説した後、実験用の器具や材料の滅菌法、実験者の手指消毒法、実験環境の消毒法を説明する。

一般的分子生物学実験に必要な器具や装置

嫌気性、微好気性：ガスポンベ、チャンバー

偏性寄生性：感染培養用の動物細胞

一般培地、特有な培地、培養器、安全キャビネット、オートクレープ、P2、P3

3. 基礎的実験法：以下の各項目を簡単に説明する。

- 1) 常在微生物と病原微生物
- 2) 材料の採取法
- 3) 分離培養法
- 4) 顕微鏡による観察法
- 5) 同定法
- 6) バイオハザード防止指針

4. 応用編：以下の項目について、ヘリコバクター・ピロリを例に説明する。

- 1) 細菌の遺伝子クローニング
- 2) 細菌の遺伝子破壊変異菌の作成
- 3) 感染モデル
- 4) 細菌のゲノム研究の現状

5. その他講義のはじめに提出された質問事項について解説する。

6. 参考図書など

- 1) Murray et al, (eds) 1995. Manual of Clinical Microbiology, 61`ed
American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 2) Koneman et al. (eds) 1997. Diagnostic Microbiology, 5`ed.
Lippincott, Philadelphia.
- 3) 三輪谷俊夫（編）1982.細菌・真菌学、医歯薬出版

「遺伝学実験法」

日時：4月13日（金）17:50～19:20

題目番号：5

担当教員：中井 彰

1 はじめに：

ヒトゲノム配列の決定は、人類の遺伝情報を理解する上で大きな一歩となった。ヒト遺伝子は20,000から30,000の遺伝子をコードしていることが判明した。最近では、タンパク質をコードしない遺伝子も重要な役割を演じていることが明らかにされ、機能を持つ「遺伝子」の数は益々増えると予想される。今後、個体を総合的に理解するために、それらの遺伝子の機能を丹念に調べる必要があるであろう。

遺伝子の機能を知るためには、多くの場合、ある決まった道筋に沿って解析が進められる。本コースでは、熱ショック転写因子ファミリー遺伝子の機能解析を例に取り、その解析の過程を概説する。

2 内容

A. 生化学的、細胞生物学的解析

a) 全長 cDNA の単離

b) 抗体の作成

大腸菌で高発現させて精製し、ウサギに免疫して抗血清を作成する。

c) mRNA の発現レベルを明らかにする。

d) in vitro 転写、翻訳系による蛋白質の生化学的解析

DNA 結合能など予想される生化学的性質について検証する。

e) 細胞へ発現させることによる生化学的解析と細胞生物学的解析

cDNA を発現ベクターに組み込み培養細胞へ導入する。オリゴマー構造や細胞内局在などを調べる。

B. 分子遺伝学的手法を用いた細胞レベルでの解析

基本的な細胞機能に関わることが予想される場合。遺伝子の相同組み替えが高頻度で起こる2つの細胞系が用いられる。

a) ニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 を用いた実験系

細胞の扱い、ならびに相同組み替え体の選別が容易。

b) マウス胚性幹細胞（ES 細胞）

細胞の扱いがやや困難。各種細胞系への分化に関わる遺伝子の機能解析に用いられる。

C. 個体レベルでの解析

a) トランスジェニックマウス：ある遺伝子を組織特異的に高発現させることでその機能を探る。導入する遺伝子により gain-of-function と loss-of-function のどちらの目的にも用いられる。

b) ノックアウトマウス：機能が全く未知な遺伝子に対しても、まずマウス作成を試みることで機能に関する糸口を探ることができる。

「生化学実験法」

日時：4月19日(木) 17:50 - 19:20

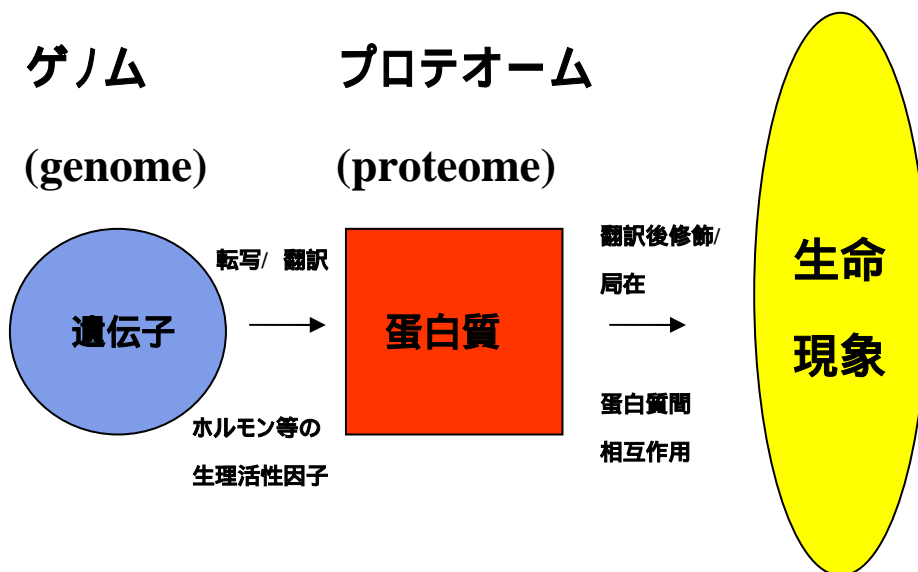
題目番号：6

担当教員：中村和行

授業内容：

ヒトおよびモデル生物の生命現象を分子レベルで理解するために、生体を構成する主な化学物質について概説し、それら化学物質の構造と機能を研究するための基本的な実験法を紹介する。特に、生体で機能分子として重要な役割を果たすタンパク質の構造と機能を網羅的に解析するプロテオーム研究法* (Proteomics) について述べる。

* 機能的に調和のとれた完全な生命現象を維持する上に必要な最小限の遺伝子群を含む染色体の一組をゲノム (genome) と呼ぶが、ゲノムを構成する全遺伝子の産物である全てのタンパク質をプロテオーム (proteome) と呼ぶ。プロテオームの網羅的かつ系統的な解析を、プロテオミクス (proteomics) と呼ぶ。Genome や proteome の語尾の -ome とは、総体をしめす。プロテオミクスの目標の一つは、ゲノムの支配を受け、基準条件下(または特定条件下)に発現している全成熟タンパク質群が、1個の細胞内にどのような編成および機能様式(総量, 個別生産量, 代謝回転速度, 高次構造構築と機能的分子集合, 活性制御様式, 局在化など)によって配置され、代謝活動に関与しているかにかかわる総合情報をデータベース化し、数理的処理によって生命システムを模擬する。この生命システムの障害により発症する様々な疾患についても、その発症機序をタンパク質や遺伝子レベルで解明することにより、新たな診断法や治療法の開発が可能になると期待される。



「細胞形態学的実験法 1」

日時：4月26日(木)、17:50-19:20

題目番号：7

担当教官：篠田 晃、石原得博

内容：光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた細胞や組織の形態観察法は、その開発以来、生命科学の研究における重要な位置を占め続け、特に細胞生物学的研究において、数nmまでの高倍率観察が可能な電子顕微鏡法は細胞内部の構造解析や物質の局在解明に必須の手法である。そして光学顕微鏡の場合と同様、電子顕微鏡観察でも、装置自身の原理とその操作を理解すること以上に、試料作製法や染色技術を理解することがより重要である。本授業では、主に電子顕微鏡観察用試料作りに関する解説と電子顕微鏡操作の見学を中心にした講義と実習を行う。

1) はじめに：可視光(400~700nm)による光顕の理論上の分解能は $0.2\mu\text{m}$ (200nm)で、細菌やミトコンドリア($0.5\mu\text{m}$:500nm)が光顕ではっきり見える限界である。これに対し、電子線の波長は速度が速いほど短くなり、加速電圧が100kVの電子顕微鏡では波長は0.004nm(0.04Å)になり、理論的には電子顕微鏡の分解能は0.002nm(0.02Å)となる。すなわち理論上は光顕の10万倍の分解能が得られる。しかし実際の分解能は最新のものでも0.1nm(1Å:丁度原子の大きさ程度)で、生物試料の場合は試料の調整、コントラスト、照射による損傷などがあるので、実際上2nm(20Å)であるが、これでも生物試料で光顕の100倍の分解能が得られており、タンパク分子ならば観察可能なのである。

電顕法は使う装置により、超薄切片を作製し組織や細胞の内部構造を観察する透過型電顕法とそれらの表面を観察する走査型電顕法に大きく分けられる。この中で通常用いられる汎用性の高い手法について以下の内容を解説する。

2) 透過型電顕試料作り：光学顕微鏡用の試料作りとは違った作製過程は、まず第一に電子線の透過力は弱いので、検鏡するには固定した組織を超薄切片(50~100nm)にしなければならないことである。それにはまず試料を脱水して樹脂包埋しプラスチックの硬い固まりにして、特別なマイクロトーム(ウルトラマイクロトーム)で超薄切片を作製した後、これを小さな金属製グリッドの上に載せて検鏡する必要がある。第二には、電子顕微鏡での試料観察では、試料中の原子番号が大きいほど多くの電子が散乱されてコントラストが強くなるが、生体分子は主に炭素、酸素、窒素、水素など原子番号の小さいものからなるので、そのままでは見えず、これにウランや鉛などの重金属塩で電子染色しなければならないということである。特にオスミウム酸による脂質膜の染色は重要で、これによって細胞の各種の膜がはっきりと観察できるようになる。そして、第三には、観察領域が高拡大されているため何処を見ているかわからぬことがあり、前もって光顕でよく観察してオリエンテーションをつけておく必要がある。注意しないと間違いまで拡大されてしまうことになる。通常の電顕観察用試料作成過程を示すと次のようになる。

組織のアルデヒド固定　オスミウム酸による後固定　脱水　エポキシ樹脂包埋　超薄切

片 ウラン鉛による二重染色

3) 免疫電顕法 (透過型): 免疫電顕法は、免疫組織化学を電顕レベルでの解析に適用したもので、目的とする抗原の微細構造レベルでの局在部位の同定、微細領域における抗原の定量、さらに多重染色の場合には抗原間あるいは抗原を提示している微細構造間の関係解明を目的としている。現行の免疫電顕法は、a) 包埋前免疫電顕法、b) 包埋後免疫電顕法、c) 無包埋免疫電顕法 (凍結超薄切片法) の三つの方法に大きく分類できる。一般的に言えることは、包埋前免疫電顕法は厚切り切片を免疫反応させるので、抗体の浸透性が悪く粒子状マーカーを使いにくく、非特異反応も起きやすいため、抗原の局在性と定量性で劣るが、光顕観察との相関ができ、また、四酸化オスミウムで膜系を強く後固定できるのでシャープな電顕像が得られる。一方、包埋後免疫電顕法や非包埋免疫電顕法では超薄切片で反応させるので、抗体の浸透性の問題は少なく、金コロイドなど粒子状マーカーが使える、抗原の局在性と定量性で優れるが、光顕観察との相関が難しく、四酸化オスミウムが使い辛いので微細構造の保持が悪い。それぞれに利点と欠点があり目的に応じて使い分けの必要がある。

(包埋前免疫電顕法) 組織固定 厚切り切片 免疫反応 組織包埋 超薄切片

(包埋後免疫電顕法) 組織固定 組織包埋 超薄切片 免疫反応

(無包埋免疫電顕法) 組織固定 組織凍結 超薄切片 免疫反応

4) 走査型電顕試料作り: 走査型電子顕微鏡像は、物質に1次電子が当たったときにその物質の表面から発生する二次電子を利用して像を得る。そのため透過型電顕用とは違った試料作製過程がある。第一に観察部位は表面に露出していなければならない。自由表面以外の観察をする際には、組織を切断したり、付着物を除去しなければならない。第二に透過型電顕試料作製における樹脂包埋と薄切の過程がない代わりに、乾燥(臨界点乾燥、凍結乾燥、自然乾燥)の過程が必要になる。第三にチャ・ジアップを防ぐために試料自体が導電性を持っているか導電性被膜で覆う必要がある。細胞内観察法の例を示すと次のような過程となる。

アルデヒド組織固定 細切 オスミウム酸後固定 凍結切断 浸軟 導電染色 脱水 臨界点乾燥 戴台 金属被着

5) その他の電顕法: 透過型電顕を使った特殊な手法として、乾燥試料に白金などの重金属を斜めから蒸着し陰影の着いた薄膜をかぶせる巨大分子観察のためのシャドウイング法、炭素の薄膜の上に試料をおいて酢酸ウランなどの重金属塩で洗い白黒反転した陰画像を得るウィルスやリボゾームなど巨大分子集合体の観察のためのネガティブ染色法、厚い試料や細胞の外表面や細胞内部調べるために、炭素や白金を蒸着して細胞成分を溶かしてレプリカを作り鑄型を観察するレプリカ法がある。また凍結防止剤(不凍液)を使って細胞を液体窒素温度で凍らせ、そのナイフによる切断面が脂質二重層の疎水性部分を通ることを利用し、白金蒸着により露出切断面のレプリカ膜を作製し電子顕微鏡で観察するフリ・ズフラクチャ法は細胞膜タンパクなどの膜内構造を研究する場合有用である。

「生命分子学研究法」

日時：5月17日（木）17:50-19:20 SCS 教室

題目番号：1

担当教員：青島均（電話:5762, e-mail:aoshima@yamaguchi-u.ac.jp）

【概要】

神経伝達物質受容体で最初に研究が進んだニコチン性アセチルコリン受容体を例にとり、様々な実験方法を紹介しながら、研究を進める上での考え方を理解してもらおう。次に、現在私の研究室で進めている研究を紹介し、いくつかの実験方法を示す。各自が研究を進める上での参考にしてもらう。

【具体的な項目】

実験材料の選択

発電魚の発電組織、特異的な標識（ブンガロトキシン）

受容体の可溶化と精製

可溶化剤の検討、アフィニティークロマトグラフィ

アミノ酸配列の部分決定と遺伝子のクローニング

遺伝子組み換え法、ライブラリーの作成とスクリーニング法、塩基配列の決定

受容体活性の測定法

ベシクルを用いたイオンの透過、アフリカツメガエル卵母細胞での発現、電気生理学的測定、パッチクランプ法

部位特異的変異による機能解析

構造の研究法

X線回折法、NMR測定法、電子顕微鏡写真の画像処理

ノックアウトマウスの作成

動物の行動実験

香りの安らぎ効果の測定

ポリフェノールの抗酸化活性と過酸化水素の生成抑制

肥満細胞からのヒスタミン放出の測定

「モデリング・数値解析法 (Modeling・Numerical Analysis)」

日時：5月24日(木) 17:50～19:20

題目番号：14

担当教官名 齊藤 俊

講義内容

科学技術分野においては、生物・化学・物理現象を原理・法則・実験式などに基づきモデル化し、数学的な記述の手助けを借りることにより、現象の理解・予測・推定を進め、天然物に対する働きかけや人工物、人造物の構築活動が行われてきている。これは、様々な現象の解明が進み、モデル化に対する多くの指針が得られていること、および、コンピュータ技術の発達によるところが大きい。本講義では、工学分野において行われているコンピュータシミュレーションの基礎となるモデリングと数値解析の基本事項について概説する。

1．数学モデル

1.1 巨視的モデル(Macroscopic Model)

生物・化学・物理現象をモデル化するための、集中質量系(lumped mass system)モデル、連続体(continuum)モデルなどについて

1.2 微視的モデル(Microscopic Model)

セルラーオートマトン(Cellular Automata)モデル、分子動力学(Molecular Dynamics)モデルなどについて

2．基礎データと計算手法

2.1 計算パラメータ

モデル化された現象をコンピュータ上で計算するために必要となる基礎データ、物理・化学・生物パラメータ、初期条件、境界条件などについて

2.2 計算手法

数値積分(Numerical Integration)、差分法(Finite Difference Method)、有限要素法(Finite Element Method)、均質化法(Homogenization Method)、モンテカルロ法(Monte Carlo Method)などについて

3．その他のコンピュータ応用技術

3.1 CTデータ援用技術について

3.2 画像処理利用技術について

4．モデリング・数値解析例

4.1 Collagen Matrix上に形成されるHA p核析出・成長モデルの解析

4.2 生体組織性状診断のための生体組織の変形解析

4.3 生体組織内音・光・熱などの伝播解析

4.4 その他